

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
受精卵培養液中のフタル酸類の受精卵及び出生児に対する影響評価研究
（H26-化学-指定-002）

分担研究報告書

分担研究：発生工学手法を用いた初期胚への *in vitro* 影響解析研究

分担研究者 安彦 行人

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・第四室

主任研究官

研究要旨

ヒト生殖補助医療における体外受精・胚移植で用いられる培養液類から正常妊娠の妊婦の血清中平均濃度の 10 倍以上のフタル酸類（フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP) 0.2 μM 及びフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP) 0.5 μM）が検出^{*1}されたことに鑑み、その胚発生および情動認知行動への影響を動物実験により詳細に解析することを目的に研究を行った。本年度までにマウス体外受精胚を MEHP 曝露条件下で胚盤胞まで培養し、仮親に移植して出生させる実験を 3 回実施し、いずれにおいても情動認知行動解析に十分な匹数のマウス個体を確保した。あわせて DNA メチル化解析・遺伝子発現解析のための胚盤胞サンプルも採取した。DEHP については培養条件の再検討を行い、DEHP を吸着することが疑われる流動パラフィンを使用せずに胚培養・マウス個体作出を試みたところ、培養液中の DEHP が胚発生を強く阻害することを示す結果を得た。またマウス ES 細胞とマウス EpiS 細胞^{*2}の比較解析を実施した。

(*1) 研究課題：化学物質への子どもへの健康影響に関するエピジェネティクス評価法の開発

(*2) ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞と性質が近いと考えられている。

A. 研究目的

生殖補助医療において、体外受精で出生する児の数は近年急激に増加しており、2013 年には 42554 人と全出生数の 4.1%を占めるに至っている。

平成 24 年度厚労科研費・化学物質リスク研究事業（*1）の調査により、ヒト体外受精に用いられる精子調製液、受精卵培養液

および添加用ヒト血清アルブミン溶液から、高濃度（母体血清中濃度の数百～数千倍）の DEHP および MEHP が検出された。これらフタル酸類が個体におよぼす影響について不足している科学的情報を、マウスを用いて取得すると共に、初期胚の化学物質曝露に対する短期間且つ高感受性の安全性評価手法を開発する。

B. 研究方法

i) マウス体外受精卵の MEHP 曝露による胚盤胞期胚およびマウス個体の作出

培養液に流動パラフィンを重ねる通常のマウス胚培養条件では、MEHP の培養液中濃度は安定であるが、DEHP は培養液中に保持されないことから、流動パラフィン重ね培養系に於いては、MEHP 曝露を実施した。C57BL/6CrSlc を過排卵処理 (eCG 5units/匹 腹腔内投与、48 時間後に hCG 5units/匹 腹腔内投与) して得た未受精卵を、同系統の凍結精子を用いて体外受精させ、MEHP (和光純薬、Lot No. TSM0238) を添加した培養液中で胚盤胞まで培養した。MEHP は媒精 3 時間後に用いる洗浄培地から添加し、用量は V 群 0 μ M、L 群 0.5 μ M、H 群 5 μ M とした。MEHP エタノール溶液 (L 群 5mM、H 群 50mM) を調製し、ヒト・リコンビナントアルブミン溶液 (Vitrolife G-MM, Lot No. 022417) 500 μ l に対し 5 μ l の割合で添加して 100 倍濃度ストック溶液 (L 群 50 μ M、H 群 500 μ M) とした。KSOMaa 培地 (Millipore、Lot No. 40530-1) にストック溶液 1/100 容を添加して MEHP 添加培養液を調製した。胚培養は 35mm プラスチックシャーレ (住友ベークライト株式会社、MS-11350) 上に 100 μ l 培養液滴を各 4 個作製し、液滴あたり胚数 20 個で実施した。培養液滴には流動パラフィン (ナカライテスク、Lot No. M4P3642) をシャーレあたり 4ml 重ねた。培養前および培養後の培養液サンプルを回収保存し、GC/MS/MS により MEHP 濃度を検出下限 0.0072 μ M にて測定した (国

立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部・河上強志博士の協力)。培養により得られた胚盤胞 (受精後 3 日) のうち 80-100 個を 20 個/匹の割合で偽妊娠 MCH マウス (交尾後 2.5 日) に移植し、17 日後に帝王切開にて産仔を得、自然交配により出産させた MCH 系マウスに里子付け (里子 4-5 匹、里親自身の子 5-6 匹の計 10 匹に数を統一) して哺育させた。出生 14 日目に里親マウスを処分して離乳させ、1 ケージあたり 4 匹にて情動認知行動解析実施 (12 週齢) まで飼育した。飼育中、少なくとも 2 週に 1 回の割合で全マウス個体の体重測定を実施した。情動認知行動解析に十分な数のマウス個体を確実に得るため、体外受精から胚培養、胚移植・胚サンプリング、帝王切開に至る実験は 3 セット (3 日) 連続で、同一個体由来の精子および同一ロット マウス由来の未受精卵を用いて行った。

また遺伝子発現解析および DNA メチル化解析のため、1 サンプルあたり 70-100 個の胚盤胞を、RLT バッファー (QIAGEN) にて溶解し、-80 にて保存した。

ii) 流動パラフィン非重ね培養系による DEHP 曝露下マウス胚培養・個体作製

前年度までの研究により、培養液滴に重ねる流動パラフィンが DEHP を強く吸着することが疑われたため、流動パラフィンを重ねない培養条件での DEHP 曝露下マウス胚培養を試みた。35mm プラスチックシャーレ (住友ベークライト株式会社、MS-11350) に KSOMaa 培地 2ml を加えてマウス胚を培

養した。操作時間を極小化し、流動パラフィン相が存在しないことによる温度・pH など培養液パラメーターの変動を最小限とするため、培養中の未受精卵・死亡胚の選別・除去は実施しなかった。DEHP(東京化成工業、Lot No. JH45M-DF) は媒精 3 時間後に用いる洗浄培地から添加し、用量は V 群 0 μ M、L 群 0.2 μ M、H 群 2 μ M とした。DEHP エタノール溶液(L 群 2mM、H 群 20mM) を調製し、ヒト・リコンビナントアルブミン溶液 (Vitrolife G-MM, Lot No. 022417) 500 μ l に対し 5 μ l の割合で添加して 100 倍濃度ストック溶液 (L 群 20 μ M、H 群 200 μ M) とした。KSOMaa 培地 (Millipore、Lot No. 40530-1) にストック溶液 1/100 容を添加して DEHP 添加培養液を調製した。培養前および培養後の培養液サンプルを回収保存し、GC/MS/MS により DEHP 濃度を検出下限 0.0095 μ M にて測定した (当所生活衛生化学部・河上強志主任研究官の協力)。培養中 DEHP 濃度の経時変化を観察するため、シャーレへの注入後 1 時間、24 時間、72 時間目に培養液を回収する実験も実施し、DEHP 濃度測定を行った。得られた胚盤胞 (受精後 3 日) を偽妊娠 MCH マウス (交尾後 2.5 日) に移植し、17 日後に帝王切開を行い着床率・満期発育率を評価した。

iii) 同一系統マウス由来 ES 細胞・EpiS 細胞のフタル酸曝露実験

ヒト ES 細胞、iPS 細胞と性質が近いと考えられるマウス細胞である EpiS 細胞と、より胎児に近いと考えられるマウス ES 細胞との間で、DEHP や MEHP に対する差

異を検討するため、同系統マウス由来の ES・EpiS 細胞を用いた曝露実験を実施した。東京大学医科学研究所、正木英樹博士より提供を受けた BDF1 系統マウス由来 ES 細胞・EpiS 細胞を、それぞれの指摘培養液にてフタル酸存在下・非存在下で培養し、核酸回収のため細胞を凍結保存した。培養には 25cm² 培養ボトル (Corning、430168) 各 3 本を使用し、ボトルあたり 0.2 x 10⁶ 個 (ES 細胞) または 0.25 x 10⁶ 個 (EpiS 細胞) を播種し、培養開始後 24、48、72、84 時間目に培養液を除去した上で、新しいフタル酸添加済み培養液 (ボトルあたり 5ml) を添加して培養し、96 時間培養後に細胞を回収した。

C. 研究結果

i) マウス体外受精卵の MEHP 曝露による胚盤胞期胚およびマウス個体の作出

MEHP 添加培養液を用いてマウス受精卵を培養し、胚盤胞移植により個体作出を独立して 3 回行った結果、2 細胞期到達率・胚盤胞到達率・着床率・移植胚数に対する出生率、出生個体の体重増加率、途中死亡率に V、L、H 各群間で顕著な差は見られなかった。3 回の実験で V 群 30-42 匹、L 群 25-35 匹、H 群 31-49 匹の マウスが得られ、情動認知行動解析のための必要数 (各群 8 匹) を満たすことができた。1 回目の実験においては、情動認知行動解析実験の対照群として、自然交配・自然分娩による C57BL/6CrSlc 子マウスの作出も行ったが、この対照群の体重増加率と比べても MEHP 曝露群との間に顕

著な差は見られなかった。

ii) 流動パラフィン非重層培養系による DEHP 曝露下マウス胚培養・個体作製

胚培養液に添加した DEHP は、流動パラフィンを重層する通常の胚培養条件下では速やかに培養液中から失われる（流動パラフィンへ移行するものと考えられる）のに対し、流動パラフィン非重層では培養開始後 72 時間においても初期添加量の 25% 程度の濃度を維持していた。流動パラフィン非重層でのマウス体外受精胚培養を実施したところ、DEHP 添加群において多くの胚が 4 細胞期で発生を停止し死亡することが観察された。培養胚に占める発生停止・死亡胚の割合は DEHP 濃度依存的に増加した。胚盤胞まで発生した DEHP 曝露胚（L 群のみ）を偽妊娠 マウスに移植し、産子を得ることを試みたが、着床率および出生率は対照群の 1/3 程度と大きく低下し、情動認知行動解析の必要数を満たす産子数は得られなかった。出生児の体重増加率に、対照群との顕著な差は見られなかった。

流動パラフィン非重層下、MEHP 添加培養液で体外受精胚を培養したところ、胚発生の停止・死亡は見られず、発生率は対照群と同等であった。DEHP 曝露の影響を「1 細胞期から 2 細胞期まで」および「2 細胞期から胚盤胞期」で比較したところ、前者では発生停止・死亡は見られなかったが、後者の群では発生停止と死亡が確認された。

iii) 同一系統マウス由来 ES 細胞・EpiS 細胞のフタル酸曝露実験

前年度に作製したストック細胞を用い、増加曲線をもとに開始細胞数をボトルあたり 0.2×10^6 個（ES 細胞）、 0.25×10^6 個（EpiS 細胞）と決定してフタル酸曝露実験を実施した。実験群は Vehicle（アルブミンのみ）、DEHP(0.2 μ M)、MEHP(0.5 μ M)、DEHP(0.2 μ M)+MEHP(0.5 μ M)とし、対照群との細胞増加率比較および細胞回収を行った。ES 細胞、EpiS 細胞とも、フタル酸添加群の細胞増加率（最終細胞数）に、対照群との顕著な差は確認されなかった。

D. 考察

生殖補助医療においては胚盤胞までの比較的長期の培養を行う手技が主流となっていることから、本研究でもマウス胚盤胞を主たる解析対象とした。

初期胚の体外培養が DNA メチル化の変化などエピジェネティックな変化をもたらすことを示唆する報告があるが、その機構や原因物質は明らかでなく、個体の発生や情動認知など生後の機能に及ぼす影響も不明である。

本年度までの実験で、体外受精から胚盤胞期まで培養した胚を母胎に移植し、マウス個体を作成する過程において、受精率・胚盤胞期までの発生率・着床および出生率・出生児の体重増加率・途中死亡率については、MEHP 曝露の有無および用量間に顕著な差は見られなかった。

MEHP 曝露受精卵を母胎に移植して生ま

れたマウスにおける情動認知行動解析に加え、MEHP 曝露胚盤胞サンプルを用いて遺伝子発現変動、DNA メチル化の変動解析を行い、安全性評価法開発のためのデータ収集を進めた。

DEHP について、流動パラフィン非重層での曝露実験を実施したところ、DEHP が濃度依存的に胚発生を阻害し、4 細胞期での発生停止・死亡をもたらすことが明らかとなった。稀に発生停止せず胚盤胞まで発生した胚においても、着床率・出生率は大きく低下していた。2 細胞期以後の DEHP 曝露では発生停止率に対照群との差がないことから、DEHP に高感受性であるのは第一卵割までの時期であると考えられた。流動パラフィン重層下では培養液中 DEHP 濃度は急速に低下することから、プレインキュベーション時間を十分に取れば培養開始時には培養液中の DEHP 濃度は低下し、胚発生への影響は抑制されると考えられた。

マウス ES 細胞とマウス EpiS 細胞の比較解析については、ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞と性質が近いと考えられるマウス由来の EpiS 細胞と、胚盤胞の内部細胞塊由来で EpiS 細胞より多能性が高いと考えられているマウス ES 細胞とでは、同一系統マウス由来であっても形状や増殖曲線といった細胞の一般性質において、かなりの差異があることを明らかにした。DEHP や MEHP を添加した群の細胞増加率（最終細胞数）に、対照群との顕著な差は確認されなかったが、他の分担研究（相崎担当）で

実施した網羅的遺伝子発現解析では、大きな差異が確認されている。今後、これらの細胞を評価系において利用する際は、安易に同一視せず、本研究で取得したそれぞれのトランスクリプトーム情報（公開予定）を参照して実施、評価するのが適切と考えられる。

E. 結論

MEHP については、MEHP 曝露受精卵を母胎に移植してマウスを作出する過程において、受精率・胚盤胞期までの発生率・着床および出生率・出生児の体重増加率・途中死亡率については、MEHP 曝露の有無および用量間に顕著な差は見られなかった。DEHP については、流動パラフィン非重層下での曝露実験により、マウス胚発生が強く阻害されることを確認したが、他方、不妊治療に於いて一般的に採用されている流動パラフィン重層培養を行えば DEHP の培養液中濃度は急速に低下することを明らかにした。従って、十分なプレインキュベーション時間を取れば培養開始時における DEHP 濃度は下がり、DEHP による胚発生への影響は抑制されると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

